



TITLE:

前立腺癌遺伝子治療の臨床応用への検討

AUTHOR(S):

後藤, 章暢; 守殿, 貞夫; CHUNG, Leland W. K.

CITATION:

後藤, 章暢 ...[et al]. 前立腺癌遺伝子治療の臨床応用への検討. 泌尿器科紀要 1997, 43(11): 829-833

ISSUE DATE:

1997-11

URL:

<http://hdl.handle.net/2433/116060>

RIGHT:

前立腺癌遺伝子治療の臨床応用への検討

神戸大学医学部泌尿器科学講座 (主任: 守殿貞夫教授)

後藤 章暢, 守殿 貞夫

ヴァージニア大学医学部泌尿器科

Leland W. K. Chung

CLINICAL APPLICATION FOR GENE THERAPY IN PROSTATE CANCER

Akinobu GOTOH, Sadao KAMIDONO

From the Department of Urology, Kobe University School of Medicine

Leland W. K. CHUNG

*From the Molecular Urology and Therapeutics Program,
Department of Urology, University of Virginia Health Sciences Center*

Hormone treatment, radiotherapy and anti-cancer chemotherapy are often used to treat prostate cancer. However, there is no effective method of treating hormone-independent prostate cancer. In this study, we attempted to establish a new treatment method for hormone-independent prostate cancer. We developed a new recombinant adenovirus vector containing a suicide gene and controlled by a tissue specific promoter, and examined the usefulness of gene therapy for hormone-independence and PSA expression in prostate cancer. We have also examined the usefulness of gene therapy involving an adenovirus and various tumor suppressor genes for human prostate cancer cells, which are under trial in the United States.

(Acta Urol Jpn. 43 : 829-833. 1997)

Key words: Gene therapy, Prostate cancer, Adenovirus, TK, Tumor suppressor gene

緒 言

前立腺癌に対して多くのホルモン療法が現在行われている。しかし、近年問題となっているホルモン非依存性の前立腺癌に対する有効な治療法は現在のところない。今回ホルモン非依存性の前立腺癌に対する新しい治療法として、アデノウイルスと自殺遺伝子を用いた組織特異性を備えた新しいベクターを開発し、その遺伝子治療への有用性を検討した。また、現在アメリカで一部臨床応用されつつある¹⁾、アデノウイルスと各種癌抑制遺伝子を用いたヒト前立腺癌細胞に対する遺伝子治療の有用性^{2,3)}についても報告する。

対 象 と 方 法

[細胞]

今回の検討に用いた代表的なヒト前立腺癌細胞は、Androgen dependent human prostate cancer cell line の LNCaP⁴⁾ である。また、LNCaP より樹立された PSA 産生性 androgen independent, tumorigenic そして metastatic な特性をもつ C4-2 cell line⁵⁾、また androgen independent human prostate cancer cell line の DU145⁶⁾、PC-3⁷⁾ を用いた、

[PSA プロモーターの比較検討]

現在、各種のベクターが開発されているが、今回我々はまだまだ問題点はあるものの、感染効率の最も優れている⁸⁾アデノウイルスベクターを利用した。アデノウイルスベクターの舵取り役を担うプロモーターに前立腺特異抗原 PSA を用い⁹⁾臓器特異的遺伝子治療法の可能性を検討した。6.1 kb と 630 bp の二種類の PSA をプロモーターとし、luciferase を組み込んだプラスミド DNA を用い、luciferase assay 法にて long (6.1 kb) と short (630 bp) construct の PSA の臓器特異性を各種培養細胞にて比較検討した。

[Thymidine kinase を用いた *in vitro* study]

アデノウイルスに PSA プロモーターと Thymidine kinase を組み込んだベクターを作製し、PSA 産生性前立腺癌培養細胞 C4-2 と PSA 非産生性の WH を用いて、Gancyclovir (GCV) の有無による殺細胞効果の程度を検討した。

[癌抑制遺伝子を用いた *in vitro* study]

癌抑制遺伝子および細胞周期調節遺伝子を用いた前立腺癌に対する遺伝子治療の検討を行った。用いた癌抑制遺伝子は1993年雑誌 Science で molecular of year に選ばれた最も代表的な p53¹⁰⁾、その下流にあるとされる p21¹¹⁾、最近見つかった cell cycle を調節

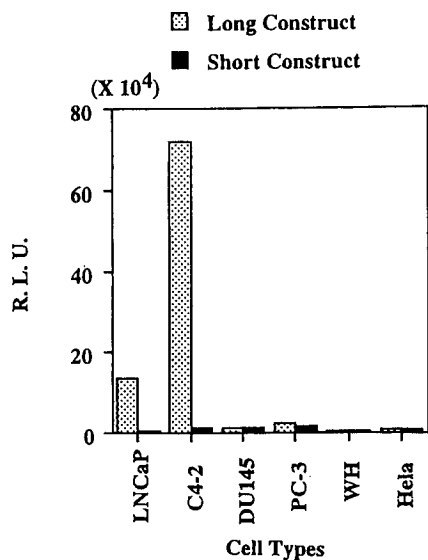


Fig. 1. Tissue specific expression of long and short PSA promoter luciferase constructs compared in LNCaP, C4-2, DU145, PC-3, WH, Hela cell lines. The long PSA promoter luciferase construct resulted significantly higher activities in PSA producing cell lines. Especially, the luciferase activity was highest in C4-2, PSA producing and androgen-independent cell line.

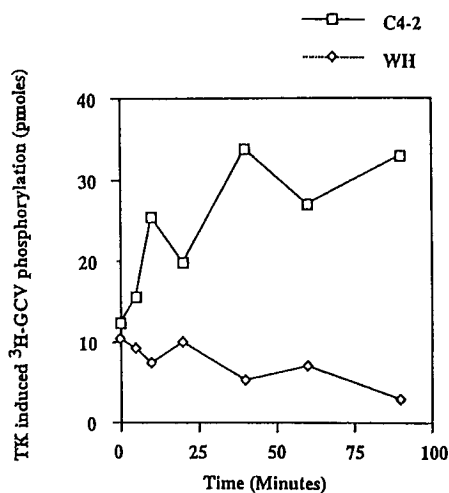


Fig. 2. Thymidine kinase activity assay. WH and C4-2 cells were infected with 20 MOI of Ad-PSA-TK with gancyclovir (10 µg/ml). TK activity, as measured by the incorporation of [³H]-GCV into cellular DNA, was detectable preferentially in C4-2 and not in WH cell line.

する p16¹²⁾ で、プロモーターは universal promoter である Cytomegalovirus (CMV) を用いた。これらのアデノウイルスベクターを感染させ、前立腺癌細胞に対する抗腫瘍性を腫瘍細胞数を計測し、コントロール群と比較検討した、

[癌抑制遺伝子を用いた *in vivo* study]

In vivo では、マウス皮下腫瘍の大きさが 300 cm³ に達した時点で治療を開始し、Virus injection は

1X10⁹PFU を三日おきに計3回行い、各ベクター間の抗腫瘍性を各種ベクターおよびコントロール群で比較検討した。

[Apoptosis assay]

p53, p21, p16 を利用したアデノウイルスベクターを用い、感染後の細胞を Tdt staining 法¹³⁾にて各 cell lines での apoptotic cell の出現をコントロールと比較検討した。

結 果

[PSA プロモーターの比較検討]

二種類のプロモーターの Luciferase assay 法¹⁴⁾での luciferase 発現程度を各種細胞で比較した。Long construct は 6.1 kb の PSA プロモーターで、Short construct は 630 bp の PSA プロモーターである。Short construct に比べ Long construct はあきらかに luciferase 発現が強く、中でも PSA 産生性の前立腺癌細胞である LNCaP や C4-2 では特に強く、他の PSA 非産生性の DU145, PC-3, コントロールとして用いた WH や Hela 細胞では発現が低かった (Fig. 1), このことより、PSA 産生性の細胞に特異的に long PSA プロモーターが作用する事が示唆された。この結果より、long PSA プロモーターと Thymidine kinase をアデノウイルスに組み込んだベクターを作製し、以下の実験を行った。

[Thymidine kinase を用いた *in vitro* study]

作製したベクターの Thymidine kinase が、実際に導入した細胞内で発現しているかどうかを調べるために、Thymidine kinase (TK) activity assay¹¹⁾にて PSA 産生性の C4-2 と PSA 非産生性の WH を用いて経時的に検討した。C4-2 のほうが明らかに高い TK activity が認められ、臓器特異的な発現を示唆する結果であった (Fig. 2),

作製したベクターの抗腫瘍性を、PSA 産生性の C4-2 と PSA 非産生性の WH を用いて、実際に Gancyclovir (GCV) を加えることによって殺細胞効果の有無を検討した。PSA 非産生性の WH では、コントロールと Ad-TK および Ad-TK に GCV を加えたものとの間に差は認められなかった。しかし、PSA 産生性の C4-2 では、Ad-TK に GCV を加えた群は他の群に比べ明らかに抗腫瘍性が認められた (Fig. 3)。

[癌抑制遺伝子を用いた *in vitro* study]

Fig. 4 はアデノウイルス p53, p21, p16 ベクターの前立腺癌細胞 (C4-2, PC-3) に対する *in vitro* での抗腫瘍効果を示している。両細胞ともコントロールおよびコントロールベクターは抗腫瘍効果は認められないが、アデノウイルス p53, p21, p16 ベクターでは抗腫瘍効果が認められた。アデノウイルス p53 ベク

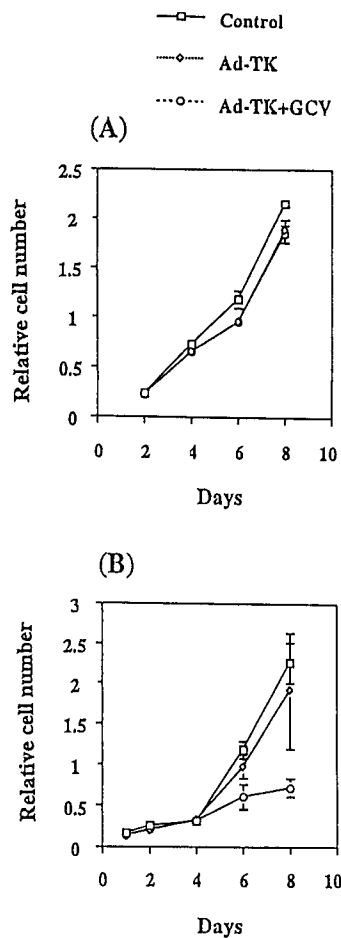


Fig. 3. Gancyclovir cytotoxicity assay. WH (A) and C4-2 (B) cells were infected with 20 MOI of Ad-PSA-TK with gancyclovir (10 μ g/ml). Whereas the growth of C4-2 cells infected with Ad-PSA-TK was markedly impaired when cells were exposed to GCV, the growth of WH cells in culture, however, was not affected. Control does not contain any gene sequences between the CMV promoter and SV40 polyadenylation sequence.

ベクターが他のベクターに比べ最も抗腫瘍効果の点で優れていた (Fig. 4)³⁾

[癌抑制遺伝子を用いた *in vitro* study]

PC-3 細胞を用いた *in vitro* の結果では, p53, p21, p16 ベクター治療群ともにコントロール群に比べ抗腫瘍性が認められた. なかでも p53 ベクター治療群が最も抗腫瘍効果の面で優れていた (Fig. 5)³⁾

[Apoptosis assay]

各種ベクターで感染させた後の前立腺癌細胞 (C4-2, PC-3) の, TUNEL 法による apoptotic cell の出現程度を検討した. 各種ベクターを投与することによって, 両 cell line ともに apoptotic cell の有意な増加が認められた. なかでも p53 ベクターは最も多くの細胞死を導くことが示唆された (Fig. 6)³⁾

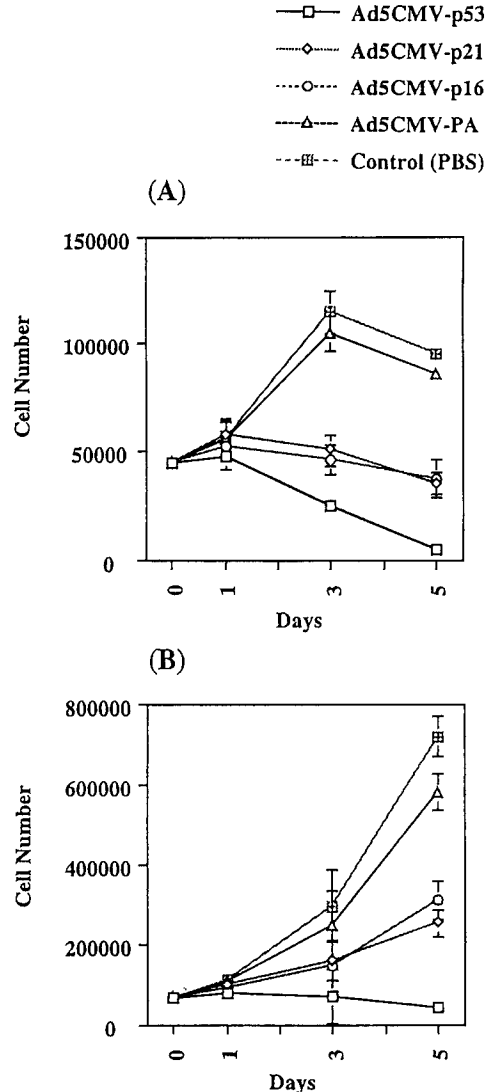


Fig. 4. Ad5CMV-p53, -p21 or -p16 inhibited prostate cancer cells, C4-2 (A) and PC-3 (B), growth as measured by cell count, whereas no growth inhibition was observed with the control virus, Ad5CMV-PA and control, PBS. The order of inhibition of tumor growth is p53 > p16 = p21.

考 察

アデノウイルスは構造的には 80 nm の大きさで, 正二十面体をした 36 kb の二本鎖 DNA を持つウイルスである. このゲノは 12 個の penton と 240 個の hexon からなる capsid で取り囲まれている¹⁶⁾

アデノウイルスのゲノム DNA の初期遺伝子 E1a, E1b はアデノウイルスの複製増殖を制御しているため, この部分を取り除くことで, 感染力を残したまま細胞内での自己複製能や増殖能を除去することが可能になった⁹⁾ 特長としては, 導入遺伝子が標的細胞の染色体 DNA の中に組み込まれず染色体外に存在し, 遺伝子導入に際して細胞の分裂増殖を必要としない,

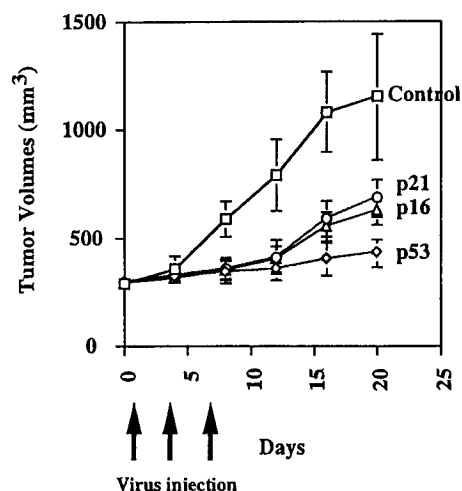


Fig. 5. Ad5CMV-p53, -p21 or -p16 is equally effective in inhibiting the growth of PC-3 tumors during a 20-day observation period. Ad5CMV-p53 is most effective in inhibiting PC-3 tumor growth when the starting tumor size is 300 mm³.

外来遺伝子を組み込む許容量は、現在普及しているものでは5～7 kb だが、細胞毒性や免疫原性を抑えた新世代のアデノウイルスベクターでは、10 kb 近くまで外来遺伝子を組み込めるようになっている¹⁶⁾ また、アデノウイルスベクターは高力価なものが精製できるため、*in vivo* 遺伝子導入も高い効率で可能である⁹⁾

今回のわれわれの検討の結果、PSA プロモーターは PSA 産生性の前立腺癌細胞では臓器特異的な作用をすることが示唆された。また、long PSA promoter は short PSA promoter に比べ PSA 産生性の前立腺癌細胞でより有効に作用することが示唆された。この結果を基に作製されたアデノウイルス long PSA promoter Thymidine kinase ベクターは、選択的に PSA 産生性の前立腺癌細胞に特異的に抗腫瘍効果を発揮することが示唆された。

癌抑制遺伝子治療では apoptosis を誘導することによって、前立腺癌細胞の増殖を抑え、前立腺癌細胞の腫瘍重量の増加が各ベクターによって抑制されている、中でも p53 ベクターが最も有効な治療効果をあげている。これらの癌抑制遺伝子を用いた各ベクターは前立腺癌に対する有用な遺伝子治療の Vehicles であると考えられる。

今回我々が用いたアデノウイルスベクターは、遺伝子導入効率や遺伝子発現効率の面では優れているが、ウイルスに対する生体の免疫反応などの多くの問題点もある^{18,19)} これらを解決するためには、遺伝子治療の基礎研究分野のより一層の発展が必要である。近年、多くの日本の研究者が活発に、遺伝子導入法の検索やベクターの開発などの基礎的研究を行っている。

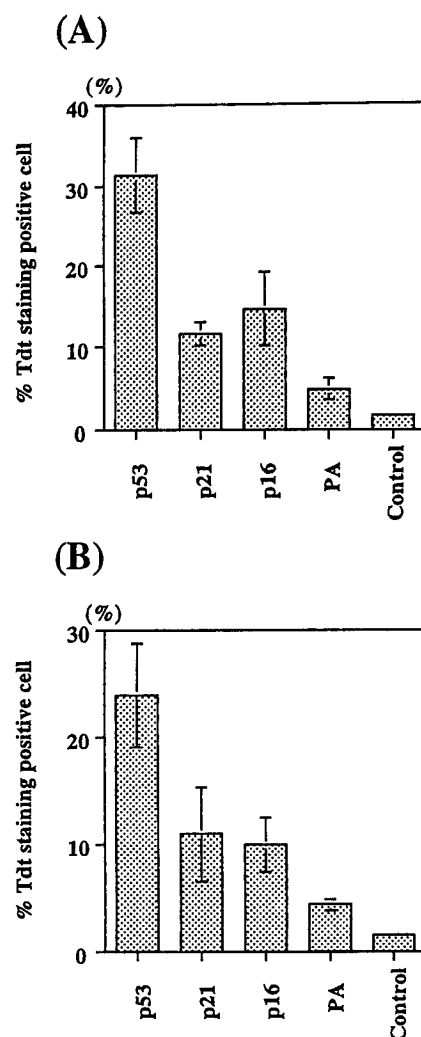


Fig. 6. Apoptosis was determined in virus infected cells, as indicated using Tdt staining, C4-2 (A) and PC-3 (B). p53 treated group had the highest percentage of cells undergoing apoptosis.

臨床面ではアメリカに追随する形態をとってはいるが、今後の日本での遺伝子治療の発展性を考慮した場合、このような基礎研究の積み重ねが重要であると考えられる。

結 語

ホルモン非依存性の前立腺癌に対する遺伝子治療の臨床応用への基礎的検討を行った。アデノウイルスと自殺遺伝子を用いた組織特異性を備えた新しいベクターは、ホルモン非依存性前立腺癌に対する遺伝子治療に有用なベクターであった。アデノウイルスと各種癌抑制遺伝子を用いたホルモン非依存性前立腺癌に対する抗腫瘍効果は p53 が勝れていた。

最後に、第46回日本泌尿器科学会中部総会会長である大阪市立大学泌尿器科岸本武利教授には、今回発表の機会を与えていただきましたことにあらためて厚く御礼申し上げます

文 献

- 1) Roth A and Cristiano RJ: Gene therapy for cancer: what have we done and where are we going. *J Natl Cancer Inst* **89**: 21-39, 1997
- 2) Ko SC, Gotoh A, Thalmann GN, et al.: Molecular therapy with recombinant p53 adenovirus in an androgen independent, metastatic human prostate cancer model. *Hum Gene Ther* **7**: 1683-1691, 1996
- 3) Gotoh A, Kao C, Ko SC, et al.: Cytotoxic effects of recombinant adenovirus p53 and cell cycle regulator genes (p21^{WAF1/CIP1} and p16^{CDKN4}) in human prostate cancers. *J Urol* **158**: 636-641, 1997
- 4) Horoszewicz JS, Leong SS, Kawinski E, et al.: LNCaP model of human prostatic carcinoma. *Cancer Res* **43**: 1809-1818, 1983
- 5) Thalmann GN, Anezinis PE, Chang SM, et al.: Androgen-independent cancer progression and bone metastasis in the LNCaP model of human prostate cancer. *Cancer Res* **54**: 2577-2581, 1994
- 6) Stone KR, Mickey DD, Wunderli H, et al.: Isolation of a human prostate carcinoma cell line (DU145). *Int J Cancer* **21**: 274-281, 1978
- 7) Kaighn ME, Narayan KS, Ohnuki Y, et al.: Establishment and characterization of a human prostatic carcinoma cell line (PC-3). *Invest Urology* **17**: 16-23, 1979
- 8) Zhang WW, Fang X, Mazur W, et al.: High-efficiency gene transfer and high-level expression of wild-type p53 in human lung cancer cells mediated by recombinant adenovirus. *Cancer Gene Ther* **1**: 5-13, 1994
- 9) Cleutjens KBJM, Vaneekelen CCEM, Vanderkorput HAGM, et al.: Two androgen response regions cooperate in steroid hormone regulated activity of the prostate specific antigen promoter. *J Biocommun* **271**: 6379-6388, 1996
- 10) Weinberg RA: Tumor suppressor genes. *Science* **254**: 1138-1146, 1991
- 11) El-Deiry WS, Tokino T, Velculescu VE, et al.: WAF1, a potential mediator of the p53 tumor suppression. *Cell* **75**: 817-825, 1993
- 12) Serrano M, Hannon GJ and Beach D: A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature* **366**: 704-707, 1993
- 13) Thiry M: Highly sensitive immunodetection of DNA on sections with exogenous terminal deoxynucleotidyl transferase and non-isotopic nucleotide analogues. *J Histochem Cytochem* **40**: 411-419, 1992
- 14) Leclerc G, Gal D, Takeshita S, et al.: Percutaneous arterial gene transfer in a rabbit model; efficiency in normal and balloon-dilated atherosclerotic arteries. *J Clin Invest* **90**: 936-944, 1992
- 15) Ives DH, Furham JP and Tucker VS: Rapid determination of nucleotide kinase and nucleotidase activities with tritium-labeled substances. *Anal Biochem* **28**: 192-205, 1969
- 16) 瀬戸口靖弘: アデノウイルスベクター, 遺伝子治療と予防, 臨床遺伝医学6, 古庄敏行編. pp43-65, 診断と治療社, 東京, 1995
- 17) Bett AJ, Prevec L and Graham FL: Packaging capacity and stability of human adenovirus type 5 vectors. *J Virol* **67**: 5911-5921, 1993
- 18) Yang Y, Nunes FA, Berencsi K, et al.: Inactivation of E2a in recombinant adenoviruses improves the prospect for gene therapy in cystic fibrosis. *Nat Genet* **7**: 362-369, 1994
- 19) 後藤章暢, 守殿貞夫: 遺伝子治療. 神緑会学術誌 **12**: 206-207, 1996

(Received on August 21, 1997)
(Accepted on October 16, 1997)